



UNIVERSITAT
POLITÈCNICA
DE VALÈNCIA



Escola Tècnica Superior
d'Enginyeria Agronòmica i del Medi Natural

Estudio de genes modificadores para el Síndrome de Dravet en *Drosophila melanogaster*

TRABAJO FINAL DE GRADO

Grado en Biotecnología

Curso 2018-2019

Valencia, julio 2019

Autor: María Hernández Ortuño

Tutor: Máximo Ibo Galindo Orozco

Cotutor externo: Andrea Tapia González



ESTUDIO DE GENES MODIFICADORES PARA EL SÍNDROME DE DRAVET EN *DROSOPHILA MELANOGASTER*

Autor: Dña. María Hernández Ortuño

Tutor académico: Prof. D. Máximo Ibo Galindo Orozco

Cotutor externo: Dña. Andrea Tapia González

Valencia, julio de 2019

RESUMEN

El síndrome de Dravet (SD) es una enfermedad rara infantil que consiste en un tipo de epilepsia caracterizada por una variedad de crisis resistentes a fármacos, frecuentemente inducidas por fiebre, que debuta a los pocos meses de edad y que generalmente deriva en discapacidad motora y cognitiva. Esta enfermedad es debida a mutaciones dominantes en el gen *SCN1A* humano que codifica un canal de sodio activado por voltaje esencial para la excitabilidad neuronal. Existe mucha variabilidad en el fenotipo de la enfermedad, es decir, no hay una sintomatología consenso descrita para todos los pacientes, ni para los que tienen la misma mutación.

Para este trabajo se ha empleado el modelo *para^{bss1}* de *Drosophila melanogaster* por ser *para* el gen homólogo al gen *SCN1A* en la mosca de la fruta y *bss1* una mutación característica de *D. melanogaster*. Con el fin de intentar entender esta variabilidad presente en la enfermedad, se han testado una serie de genes candidatos a modificadores genéticos del gen *para* en este modelo. Los modificadores genéticos son genes que no están directamente implicados en la enfermedad, pero alteran o influyen en la expresión de la función de otro gen, segregándose independientemente de la mutación principal. Dichos genes están relacionados con procesos de neurodesarrollo o comunicación sináptica, y tienen su homólogo correspondiente en *D. melanogaster*. La estrategia genética empleada para alterar su expresión se basa en el uso del sistema UAS-GAL4 para expresar un RNA interferente. La metodología para el estudio de estos once genes es la realización de ensayos de crisis, ensayos de supervivencia y ensayos de locomoción.

En los ensayos se ha comprobado la relación de estos 11 genes, candidatos a modificadores genéticos, con el gen mutado *para^{bss1}* en el fenotipo de la enfermedad. En el silenciamiento de los genes *CG8916*, *Cax1T*, *KCNQ*, *nAChRα4*, *Clc-a* y *Slo* se observan diferencias importantes en los tres ensayos realizados: disminución del tiempo de recuperación tras una crisis, aumento de la supervivencia y aumento de la longitud recorrida durante un tiempo de exploración, revelando así el silenciamiento de estos genes como supresor del fenotipo del SD. *Toy* es el único gen modificador en el cual su silenciamiento es potenciador del fenotipo del SD, mostrando una gran disminución de la vida media de las moscas. Estos genes podrían ejercer como dianas terapéuticas y herramientas de diagnóstico del SD.

Palabras clave: Síndrome de Dravet, gen modificador, crisis, supervivencia, locomoción

STUDY OF MODIFYING GENES FOR DRAVET SYNDROME IN *DROSOPHILA MELANOGASTER*

Author: Ms. María Hernández Ortuño

Academic tutor: Prof. Mr. Máximo Ibo Galindo Orozco

External co-tutor: Ms. Andrea Tapia González

Valencia, July 2019

ABSTRACT

Dravet syndrome (DS) is a rare childhood disease consisting of a type of epilepsy characterized by a variety of seizures resistant to drugs, frequently induced by fever. The disease begins at a few months of age and usually results in motor and cognitive disability. This disease is due to dominant mutations in the human *SCN1A* gene that encodes a voltage-activated sodium channel essential for neuronal excitability. There is a lot of variability in the phenotype of the disease, that is, there is no consensus symptomatology described for all patients, nor for those with the same mutation.

For this study, the *Drosophila melanogaster para^{bss1}* model has been used because *para* is the gene homologous to the *SCN1A* gene in the fruit fly and *bss1* is a characteristic mutation of *D. melanogaster*. In order to try to understand this variability present in the disease, some genes that are candidates for genetic modifiers of the gene *para* have been tested in this model. Genetic modifiers are genes that are not directly involved in the disease, but alter or influence the expression of the function of another gene, segregating independently of the main mutation. These genes are related to processes of neurodevelopment or synaptic communication, and they have their corresponding counterpart in *D. melanogaster*. The genetic strategy used to alter its expression is based on the use of the UAS-GAL4 system to express an interfering RNA. The methodology for the study of these genes is the execution of crisis trials, survival trials and locomotion trials.

In the trials, the connection of these modifying genes with the mutated *para^{bss1}* gene in the disease phenotype has been verified. In the silencing of *CG8916*, *Caa1T*, *KCNQ*, *nAChR α 4*, *Clc-a* and *Slo* genes, important differences have been observed in the three tests performed: decreased recovery time after a crisis, increased survival and increase in the length traveled during an exploration time, thus revealing the silencing of these genes as a suppressor of the SD phenotype. *Toy* is the only modifier gene in which its silencing is an enhancer of the SD phenotype, showing a large decrease in the half-life of flies. These genes could act as therapeutic targets and diagnostic tools for DS.

Key words: Dravet syndrome, modifier gene, crisis, survival, locomotion

Agradecimientos

M'agradaria dedicar aquest treball a varies persones. En primeríssim lloc, a Andrea. Per moltes vegades que et done les gràcies, no va a ser suficient. Però... gràcies per acollir-me en el teu laboratori, donar-me el teu lloc de treball, el teu ordinador, el teu disc dur, i el més valuós, el teu temps. Eres la tutora perfecta en tots els aspectes: no m'has fet matinar, em deixaves eixir abans (poques vegades jeje), entens el meu humor, estàs sempre pendent de mi, em corregeixes el TFG unes mil vegades al dia, cuides de les nostres mosques, inclús en festius... no sé que més es pot demanar. Encara que tens que reconèixer que tu tampoc ho has passat mal. Saber que puc confiar en tu per a qualsevol cosa... has sigut un gran suport. Mil gràcies per tot i et desitge molta sort en tot el que està per vindre, t'ho mereixes. Ha sigut un plaer i m'ho he passat súper bé.

En segundo lugar, a Ibo. Muchísimas gracias por no dudar ni un segundo en acogerme en tu laboratorio, por ayudarme a conseguir estas prácticas, por no poner nunca ni una sola pega y por ser tan majo. Eres un profe excelente, divertido y cercano, y eso se agradece mucho. Muchísimas gracias por todo, y también al CIPF y Asociación del Síndrome de Dravet.

Agradecer también a Irene. Has sido una gran compañera y un gran apoyo. Gracias por todas esas horas dedicadas a ayudarme con los experimentos (estando yo o no). Has sido la complicidad que necesitaba para que esta experiencia fuese de 10. Me lo he pasado tan bien y me he reído tanto: ese último día viendo los delfines, los ensayos de 'locomo', los experimentos fallidos que sólo tu conseguías que saliesen... Mil gracias, no sé qué hubiese hecho sin ti. Me llevo una amiga. Estás disfrutando un montón en Alemania, y me alegro muchísimo. Nos vemos nada más vuelvas. Aprovecho también para agradecer a Andrés, que sin él no sé qué hubiese sido de la parte informática de este trabajo. Muchísimas gracias.

Amb aquest treball es tanca una etapa molt important i bonica de la meua vida. Sense pensar-ho, em vaig vindre a viure a València... i ací em vaig quedar. Necessitava un canvi d'aires, i la por que sentia al principi d'aquesta aventura ha acabat donant-me la millor de les experiències.

Mamá, gracias por todo y más. Es que sin ti no sé qué sería de mí. Todos los momentos y aventuras que compartimos me hacen tan feliz... Papà, gràcies i gràcies per animar-me sempre a arriscar, per estar disposat a ajudar-me a qualsevol hora del dia i confiar sempre en mi. Xavi... encara que no t'ho diga mai, i sigues més xicotet, t'admire moltíssim i confie en cada una de les decisions que prens. Gràcies per estar al meu costat i ajudar-me (casi siempre, cabut) en tot el que necessite. Us estime moltíssim.

Neus... Juntas desde casi el principio i juntas hasta el final, sempre. Gràcies per tot... gràcies per salvar-me casi sense adonar-te'n i gràcies per donar-me tot el suport que necessite. Eres la compí perfecta, i tots els moments de risas i baralles no les canvie per res. T'estime molt.

Madre mía Clau, que hubiese sido de mí en la universidad si no hubieses estado a mi lado... Gracias infinitas por todo, ya lo sabes. Marina, mi compí fiel. Carmen, Paula, Gloria, Nora y Carmen, gracias por estos 4 años y los que quedan. Os quiero muchísimo. A todos los biotecs... qué gran familia hemos formado, no me hubiesen podido tocar mejores compis, de verdad. Grandes fiesteros y mejores personas. Os quiero y os voy a echar de menos.

Índice

1. Introducción.....	1
1.1. Síndrome de Dravet.....	1
1.2. Genes modificadores en el Síndrome de Dravet.....	2
1.3. <i>Drosophila melanogaster</i> como organismo modelo en epilepsia.....	4
2. Objetivos	9
3. Materiales y métodos	10
3.1. Colección de moscas.....	10
3.2. Ensayos	11
3.2.1. Ensayos de crisis.....	11
3.2.2. Ensayos de supervivencia.....	11
3.2.3. Ensayos de locomoción.....	11
3.3. Análisis de datos.....	13
4. Resultados	14
4.1. Genes modificadores de <i>SCN1A</i>	14
4.1.1. Gen <i>Cac</i>	15
4.1.2. Gen <i>Ca-β</i>	16
4.1.3. Gen <i>nAChRα1</i>	17
4.1.4. Gen <i>Clc-a</i>	18
4.1.5. Gen <i>CG8916</i>	19
4.1.6. Gen <i>Pdp1</i>	20
4.1.7. Gen <i>Cα1T</i>	21
4.1.8. Gen <i>nAChRα4</i>	22
4.1.9. Gen <i>KCNQ</i>	23
4.1.10. Gen <i>Slo</i>	24
4.1.11. Gen <i>Toy</i>	25
5. Discusión.....	26
6. Conclusiones	28
7. Bibliografía.....	29

Índice de figuras

Figura 1. Organización de SCN1A.	1
Figura 2. Ciclo de desarrollo de <i>Drosophila melanogaster</i>	5
Figura 3. Fases de una crisis en <i>Drosophila melanogaster</i>	6
Figura 4. Mosca que expresa GAL4 y promotor específico (izquierda) y mosca que expresa el transgén aguas abajo de un UAS (derecha). Moscas necesarias para realizar el cruce y obtener el sistema GAL4-UAS.	7
Figura 5. Imagen obtenida con el programa informático ImageJ. Se muestran en rojo aquellos puntos de la imagen que no son de tono blanquecino/gris claro.	11
Figura 6. Imagen obtenida con el programa informático ImageJ. Tras modificar la escala de color, se muestra en rojo únicamente el punto donde está la mosca.	12
Figura 7. Imagen obtenida con el programa informático ImageJ. Ejemplo del recorrido de una mosca, la cual tiene poca capacidad de exploración y su recorrido es de poca distancia.	12
Figura 8. Imagen obtenida con el programa informático ImageJ. Ejemplo del recorrido de una mosca, la cual tiene una gran capacidad de exploración y su recorrido es de mucha distancia.	12
Figura 9. Gen <i>Cac</i> . Resultados gráficos de: A: Ensayo de crisis; B: Ensayo de supervivencia; C: Ensayo de locomoción.	15
Figura 10. Gen <i>Ca-β</i> . Resultados gráficos de: A: Ensayo de crisis; B: Ensayo de supervivencia; C: Ensayo de locomoción.	16
Figura 11. Gen <i>nAChRα1</i> . Resultados gráficos de: A: Ensayo de crisis; B: Ensayo de supervivencia; C: Ensayo de locomoción.	17
Figura 12. Gen <i>Clc-a</i> . Resultados gráficos de: A: Ensayo de crisis; B: Ensayo de supervivencia; C: Ensayo de locomoción.	18
Figura 13. Gen <i>CG8916</i> . Resultados gráficos de: A: Ensayo de crisis; B: Ensayo de supervivencia; C: Ensayo de locomoción.	19
Figura 14. Gen <i>Pdp1</i> . Resultados gráficos de: A: Ensayo de crisis; B: Ensayo de supervivencia; C: Ensayo de locomoción.	20
Figura 15. Gen <i>Cax1T</i> . Resultados gráficos de: A: Ensayo de crisis; B: Ensayo de supervivencia; C: Ensayo de locomoción.	21
Figura 16. Gen <i>nAChRα4</i> . Resultados gráficos de: A: Ensayo de crisis; B: Ensayo de supervivencia; C: Ensayo de locomoción.	22
Figura 17. Gen <i>KCNQ</i> . Resultados gráficos de: A: Ensayo de crisis; B: Ensayo de supervivencia; C: Ensayo de locomoción.	23
Figura 18. Gen <i>Slo</i> . Resultados gráficos de: A: Ensayo de crisis; B: Ensayo de supervivencia; C: Ensayo de locomoción.	24
Figura 19. Gen <i>Toy</i> . Resultados gráficos de: A: Ensayo de crisis; B: Ensayo de supervivencia; C: Ensayo de locomoción.	25

Índice de tablas

Tabla 1. <i>Función y estudios previos de los candidatos a genes modificadores de SCN1A estudiados.</i>	3
Tabla 2. <i>Genes candidatos a modificadores genéticos de SCN1A.</i>	10
Tabla 3. <i>Significación estadística de los ensayos de crisis, supervivencia y locomoción.</i>	26

Abreviaturas y simbología

BDSC: Bloomington Drosophila Stock Center

BLAST: Basic Local Alignment Search Tool

BS: *bang-sensitive*

D. melanogaster: *Drosophila melanogaster*

EE: estado epiléptico

GAL4: factor de transcripción regulador positivo de la expresión génica de los genes inducidos por galactosa

HFS: high frequency stimulation

ILAE: International League Against Epilepsy

NCBI: National Center for Biotechnology Information

NIGJapan: National Institute of Genetics in Japan

para: *paralytic*

pb: par de bases

RNAdc: RNA de doble cadena

RNAi: RNA de interferencia

RNAm: RNA mensajero

RNAi: RNA pequeño de interferencia

SD: Síndrome de Dravet

SMEI: Epilepsia Mioclónica Severa de la Infancia

TRiP: Transgenic RNAi Project

UAS: secuencia de activación en sentido ascendente

VDRC: Vienna Drosophila RNAi Center



: hembra virgen



: macho

1. Introducción

1.1. Síndrome de Dravet

El síndrome de Dravet (SD), también conocido como Epilepsia Mioclónica Severa de la Infancia (SMEI), es una enfermedad de origen genético (FUNDACIÓN SÍNDROME DE DRAVET, 2019) que fue descrita por primera vez en Francia en 1978 (Dravet, 2011) por la psiquiatra y epileptóloga Charlotte Dravet (FUNDACIÓN SÍNDROME DE DRAVET, 2019). Se incluye como un síndrome epiléptico en la clasificación de la Liga Internacional contra la Epilepsia (ILAE) (Claes *et al.*, 2001). Debido a que el componente mioclónico de esta epilepsia no siempre estaba presente y a que se observó cierta variabilidad en la sintomatología, además de haber un número creciente de casos y definirse con mayor precisión las características de esta epilepsia, se llevó a cabo un cambio en su nombre de SMEI a SD en 1989 (Dravet, 2011).

El SD es un tipo de epilepsia hereditaria infantil caracterizada por una variedad de crisis resistentes a fármacos y frecuentemente inducidas por fiebre, presentándose en niños, por lo demás, sanos, y que generalmente deriva en discapacidad motora y cognitiva. Presenta una herencia autosómica dominante (ORPHANET, 2019). Se trata de una enfermedad neurológica que cursa principalmente con crisis epilépticas no controladas, retraso mental y alteraciones conductuales graves, así como con uno de los índices de mortalidad más elevado entre los síndromes epilépticos (APOYO DRAVET, 2017). Es considerada una enfermedad rara, con una incidencia global menor a 1 por 40.000 (Hurst, 1990). Se calcula que en España debiera haber más de 1000 afectados. Actualmente, se estima que hay unos 250-350 afectados correctamente diagnosticados (APOYO DRAVET, 2017).

Se clasifica dentro de la familia patológica de las canalopatías, ya que aproximadamente el 75% de los pacientes afectados presenta una mutación en el gen *SCN1A* [Figura 1]. Dicho gen codifica para la subunidad α de tipo I del canal de sodio, denominado Nav1.1, activado por voltaje esencial para la excitabilidad neuronal. Este gen alterado es incapaz de generar proteína funcional adecuada para mantener un correcto funcionamiento cerebral. Hasta la actualidad, se han descrito más de 800 mutaciones diferentes en *SCN1A* en pacientes con SD, distribuidas aleatoriamente a lo largo de los 26 exones que componen el gen (FUNDACIÓN SÍNDROME DE DRAVET, 2019). Las deleciones, duplicaciones y amplificaciones intragénicas o del gen completo son mecanismos moleculares raros adicionales (Guerrini, 2012). La mayoría de las mutaciones de *SCN1A* son de novo. Existe un 5-10% de mutaciones familiares (FUNDACIÓN SÍNDROME DE DRAVET, 2019).

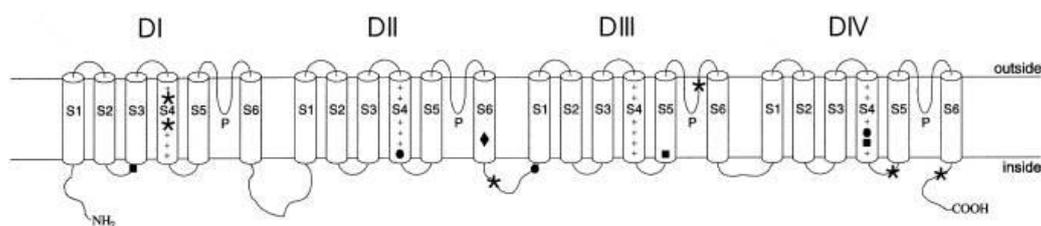


Figura 1. Organización de *SCN1A*. La subunidad α del canal de sodio dependiente de voltaje neuronal *SCN1A* es un monómero y consta de cuatro dominios homólogos (DI - DIV). Cada dominio tiene seis segmentos transmembrana (S1 - S6). Las mutaciones se indican con asteriscos, diamantes, círculos y cuadrados] (Claes *et al.*, 2001).

El inicio de la primera crisis ocurre principalmente durante el primer año de vida (habitualmente a los 5-8 meses de edad) en niños previamente asintomáticos, por lo demás sanos, y consiste, en la mayoría de los casos, en crisis clónicas unilaterales o generalizadas. Generalmente, la fiebre desencadena las crisis, que pueden ser crisis tónico-clónicas generalizadas y crisis clónicas unilaterales alternantes. También se han descrito crisis afebriles parciales complejas y focales durante el curso de la enfermedad. Algunas crisis pueden presentarse como estado epiléptico febril (EE) de más de 20 minutos de duración. La frecuencia del EE durante el primer año puede ser elevada, aunque generalmente disminuye con el tiempo. También pueden darse crisis parciales complejas. La fotosensibilidad, las altas temperaturas, la estimulación fónica intermitente y el ejercicio también pueden provocar crisis. A los 2 años de edad, el retraso del desarrollo es, con frecuencia, aparente, seguido por un efecto meseta del desarrollo cognitivo y discapacidad. En esta etapa también pueden aparecer trastornos del habla, ataxia, trastornos del sueño y, en ocasiones, signos piramidales. Las crisis pueden desaparecer en la edad adulta, aunque la mayoría de los afectados presenta crisis continuadas refractarias al tratamiento (ORPHANET, 2019).

Los síntomas del Síndrome de Dravet se basan en la neurotriada: crisis epilépticas, afectación cognitiva y alteraciones conductuales. Pueden presentar crisis epilépticas resistentes a la medicación actual y retraso mental en la mayoría de los afectados, problemas del lenguaje y la comunicación. Estos pueden ir acompañados de otras alteraciones neurológicas como: la ataxia, temblor en reposo, síntomas del espectro autista en ocasiones y una elevada presencia de hiperactividad y trastorno de la atención, problemas motores y ortopédicos (escoliosis y pies valgos, entre otros), trastornos del sueño, alteraciones endocrinológicas y metabólicas, muerte súbita en rangos elevados y otras afectaciones. Muchos de estos síntomas son encontrados en los pacientes de forma habitual (APOYO DRAVET, 2017).

1.2. Genes modificadores en el Síndrome de Dravet

Los modificadores genéticos o genes modificadores son aquellos que alteran o influyen en la expresión de la función de otro gen, segregándose independientemente de la mutación principal. Estos genes, no estando implicados directamente en la enfermedad, pueden influir en diferentes aspectos de la patología, como en la penetrancia, la edad de aparición, la progresión o la gravedad de la enfermedad, desempeñando así un papel importante en la gravedad clínica de la enfermedad neurológica (Kearney, 2011).

En el SD, los candidatos a genes modificadores del gen *SCN1A* son de gran interés en la investigación, ya que su estudio puede ayudar a explicar la variabilidad fenotípica que existe en esta enfermedad, incluso en los pacientes que tienen la misma mutación. Además, también pueden ayudar a conocer mejor los mecanismos fisiopatológicos y encontrar nuevas dianas terapéuticas.

En un trabajo de fin de máster previo (Ñungo, 2018), se llevó a cabo una selección de candidatos a genes modificadores de *SCN1A*: primero se identificaron genes candidatos en pacientes humanos y posteriormente se escogieron los que están conservados en *D. melanogaster*. Así, la lista para este trabajo quedó compuesta por 11 genes candidatos a modificadores genéticos de *SCN1A*.

A continuación, se describen los 11 genes seleccionados como candidatos a modificadores genéticos de *SCN1A* [Tabla 1]:

Tabla 1. Función y estudios previos de los candidatos a genes modificadores de *SCN1A* estudiados.

Gen Humano	Gen en <i>D. melanogaster</i>	Función (OMIM, 2019)	Estudios relacionados con la epilepsia
<i>CACNA1A</i>	<i>Cac</i>	Codifica la subunidad $\alpha 1A$ del canal de calcio voltaje dependiente tipo P/Q.	Descrito como potenciador de las mutaciones en <i>SCN1A</i> en humanos. Los pacientes con SD que además tienen variantes en <i>CACNA1A</i> presentan crisis de ausencia con mayor frecuencia que los pacientes con solo mutaciones de <i>SCN1A</i> (8/20 vs. 0/20, $p = 0,002$). Además, muestran un inicio más temprano de convulsiones y convulsiones prolongadas más frecuentes antes de un año de edad (Ohmori <i>et al.</i> , 2013).
<i>CACNB4</i>	<i>Ca-β</i>	Codifica la subunidad auxiliar $\beta 4$ del canal de calcio voltaje dependiente.	Descrito como potenciador de las mutaciones en <i>SCN1A</i> en un paciente humano que presentaba una mutación non sense (R468Q) en dicho gen, que mostraba una mayor densidad de corriente de Ba^{2+} en comparación con el <i>CACNB4</i> de tipo salvaje. Las mayores corrientes de Cav2.1 causadas por la mutación R468Q- <i>CACNB4</i> pueden aumentar la liberación de neurotransmisores en las neuronas excitadoras bajo la condición de insuficientes neuronas inhibitorias causadas principalmente por la mutación <i>SCN1A</i> , generando un fenotipo epiléptico más grave (Ohmori <i>et al.</i> , 2008)
<i>CHRN2</i>	<i>nAChR$\alpha 1$</i>	Codifica la subunidad $\beta 2$ del receptor colinérgico neuronal nicotínico.	Ha sido estudiado en unos pacientes humanos, los cuales eran hermanos que sufrían epilepsia y tenían mutaciones en <i>CHRN2</i> (Fjaer <i>et al.</i> , 2015).
<i>CLCN1</i>	<i>Clc-a</i>	Codifica el canal de cloro voltaje dependiente I.	Ha sido estudiado en pacientes humanos y en murinos, dejando clara la relación de <i>CLCN1</i> con la epilepsia (Chen <i>et al.</i> , 2013).
<i>GABRA1</i>	<i>CG8916</i>	Codifica la subunidad $\alpha 1$ del receptor de GABA tipo A.	Ha sido estudiado en pacientes humanos con SD con <i>SCN1A</i> -negativo (no hay mutaciones en <i>SCN1A</i> , pero sí en <i>GABRA1</i>) (Carvill, 2014).
<i>HLF</i>	<i>Pdp1</i>	Codifica el factor de leucemia hepático.	Ha sido estudiado en ratones y descrito como modificador genético de epilepsia (Hawkins y Kearney, 2016).
<i>CACNA1G</i>	<i>Caa1T</i>	Codifica la subunidad $\alpha 1G$ del canal de calcio voltaje dependiente tipo T.	Descrito como modificador del fenotipo epiléptico de las mutaciones en <i>SCN2A</i> por Calhoun en 2016, que demostró que ratones <i>SCN2A</i> (Q54) en los que se aumentaba la expresión de <i>CACNA1G</i> , mostraban un

			aumento en la frecuencia de crisis espontáneas, mientras que al reducir su expresión se disminuía la frecuencia de crisis (Calhoun <i>et al.</i> , 2016).
<i>CHRNA4</i>	<i>nAChRα4</i>	Codifica la subunidad α 2 del receptor colinérgico neuronal nicotínico.	Es un importante mediador de la transmisión rápida de señales sinápticas. Se han identificado mutaciones en este gen en pacientes con epilepsia frontal nocturna autosómica dominante (Lopes-Cendes y Oliveira, 2013).
<i>KCNQ3</i>	<i>KCNQ</i>	Codifica el miembro 3 de la subfamilia KQT del canal de potasio voltaje dependiente.	Se han descrito mutaciones en <i>KCNQ3</i> en familias con epilepsia neonatal familiar benigna (Lopes-Cendes y Oliveira, 2013).
<i>KCNMA1</i>	<i>Slo</i>	Codifica el canal de potasio activado por calcio de la subfamilia M α 1.	Se han descrito mutaciones en este gen en pacientes con discinesia paroxística no cinesigénica con epilepsia generalizada y con atrofia cerebral, retardo del desarrollo y crisis epilépticas (Lopes-Cendes y Oliveira, 2013).
<i>PAX6</i>	<i>Toy</i>	Codifica un regulador transcripcional involucrado en la oclugénesis y otros procesos de desarrollo.	Descrito un sitio de unión a microRNA-328 en <i>PAX6</i> que está asociado con picos centrotemporales de epilepsia rolandica (Panjwani <i>et al.</i> ,2016).

1.3. *Drosophila melanogaster* como organismo modelo en epilepsia

Drosophila melanogaster (*D. melanogaster*), conocida como la mosca de la fruta o del vinagre, es un organismo modelo genético bien estudiado y muy manejable para comprender los mecanismos moleculares de las enfermedades humanas. Muchas de las propiedades biológicas, fisiológicas y neurológicas básicas se conservan entre los mamíferos y *D. melanogaster*, y se cree que casi el 75% de los genes que causan enfermedades en los humanos tienen un homólogo funcional en la mosca, por lo que se considera un buen modelo de enfermedades humanas e incluso para testar medicamentos (Pandey y Nichols, 2011).

Este organismo presenta varias características únicas que lo hacen un buen modelo animal para las enfermedades humanas, y en este caso, para el SD. Una de ellas es el ciclo de vida particularmente corto, que permite la rápida generación de grandes cantidades de progenie para usar en cruces genéticos. El proceso de desarrollo de un huevo fertilizado a un adulto [Figura 2] requiere en promedio de sólo 9-10 días a 25°C (Hales *et al.*, 2015).

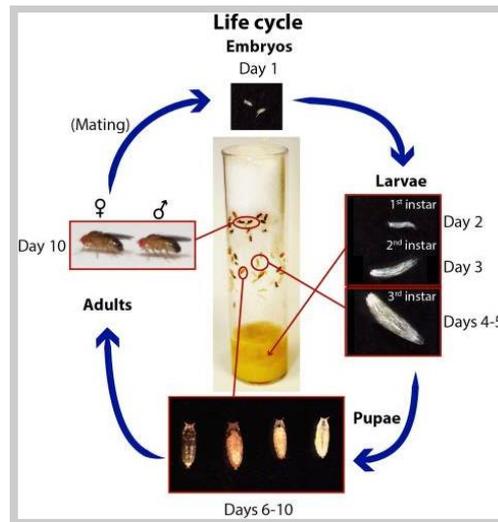


Figura 2. Ciclo de desarrollo de *Drosophila melanogaster* (Hales et al., 2015).

Otra de estas características es su fácil cultivo en el laboratorio (Hales et al., 2015), y el costo extremadamente bajo de mantenimiento, propagación y detección, así como la rapidez de los estudios sobre la marcha en comparación con los modelos tradicionales basados en mamíferos. Además, el genoma se ha secuenciado y anotado completamente (Pandey y Nichols, 2011), siendo este muy compacto y fácil de manipular (Hales et al., 2015). *D. melanogaster* tiene una situación anatómica bien conocida: su sistema nervioso es simple y las vías moleculares están altamente conservadas (Jeibmann y Paulus, 2009). La identidad general a nivel de nucleótido o secuencia de proteínas entre la mosca y el mamífero suele ser de aproximadamente el 40% entre homólogos; sin embargo, en dominios funcionales conservados, puede ser de 80 a 90% o más (Pandey y Nichols, 2011).

Los cromosomas equilibradores son una característica ventajosa de la mosca de la fruta para estudiar genética. Estos son cromosomas portadores de mutaciones marcadoras, es decir, fácilmente observables fenotípicamente. Además, estos cromosomas múltiples invertidos difícilmente recombinan con sus homólogos normales, y la mayoría de ellos son letales en homocigosis (Greenspan, 2004). En este trabajo se ha empleado CyO (fenotipo de alas curvadas).

Las técnicas genéticas permiten el control preciso de la expresión génica temporal y espacialmente. Además, una gran colección de mutantes muestra una amplia gama de susceptibilidad de ataques (Kroll y Tanouye, 2013). Este organismo se puede utilizar de manera efectiva para análisis de medicamentos de bajo a alto rendimiento, así como en el descubrimiento de dianas (Pandey y Nichols, 2011).

D. melanogaster tiene similitudes a nivel celular y subcelular con el sistema nervioso de mamíferos, teniendo canales de membrana dependientes de voltaje y de ligando para el sodio, potasio, calcio y receptores de acetilcolina, glutamato y el ácido gamma-aminobutirato (GABA). Pero también tiene diferencias, destacando la organización del sistema nervioso central entre ellas (Parker et al., 2011).

Debido al hallazgo de una cepa de *D. melanogaster* llamada “bang-sensitive” (BS), donde todos los mutantes eran sensibles a convulsiones, permitió la utilización de éste como modelo de

convulsiones. La actividad eléctrica similar a una convulsión es provocada por trenes de onda corta de estímulos eléctricos de alta frecuencia (HFS, pulsos de 0,4 ms a 200 Hz durante 300 ms) administrados al cerebro a una intensidad suficiente y registrados desde los músculos del vuelo torácico (Parker *et al.*, 2011).

Se induce un comportamiento anormal en *para^{bss1}* después de un choque mecánico, un golpecito del frasco de cultivo o una breve mezcla de vórtice (un "bang") (Parker *et al.*, 2011). El fenotipo de comportamiento resultante es complejo, con seis fases distinguibles [Figura 3]:

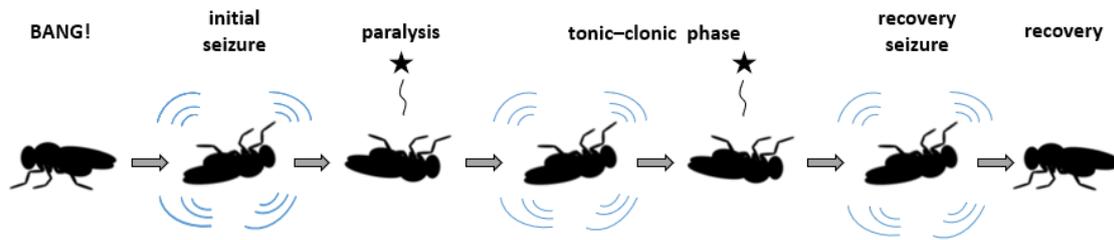


Figura 3. Fases de una crisis en *Drosophila melanogaster*. Imagen adaptada de (Parker *et al.*, 2011).

- i. Convulsión inicial. Dura varios segundos y se caracteriza por el temblor de la pierna, las contracciones de los músculos abdominales, el aleteo y las extensiones de la probóscide.
- ii. Período paralítico. Las moscas *para^{bss1}* son inmóviles y no responden a estímulos mecánicos.
- iii. Fase "tónico-clónica". A diferencia de otros mutantes BS, la parálisis inicial en *para^{bss1}* es seguida por un período prolongado donde la mosca es principalmente inactiva, sufriendo intermitentemente salvas de sacudidas generalizadas.
- iv. Crisis de recuperación. La mosca presenta de nuevo movimientos parecidos a la crisis inicial junto con pequeñas sacudidas.
- v. Se observa un período refractario en *para^{bss1}*, durante el cual las moscas ya logran comportarse normalmente, pero no se les puede inducir a tener más ataques por ningún estímulo externo.
- vi. Finalmente, hay una recuperación completa y las moscas *para^{bss1}* recuperan la sensibilidad del golpe.

(Parker *et al.*, 2011)

Con el fin de alterar la expresión de los genes modificadores, se ha usado la técnica del RNAi. El RNA de interferencia (RNAi) es un mecanismo intracelular por el cual se consigue silenciar genes, mediante moléculas de RNA de doble cadena (RNA_{dc}). El silenciamiento de genes se da por la interacción de complejos enzimáticos en el citoplasma con pequeñas moléculas de RNA (RNA_{si}), las cuales actúan sobre el RNA mensajero (mRNA) endógeno, impidiendo que sea traducido a proteína (Noriega, 2016). Utilizada inicialmente para bloquear la función de genes individuales

de interés, la tecnología se aprovechó en varios organismos a escala global con la producción de bibliotecas de RNAi para silenciar la mayoría de los genes en sus genomas, lo que permite la detección de la pérdida de todo el genoma (Boutros y Ahringer, 2008).

En *Drosophila* es muy frecuente el uso de RNAi y se puede introducir en la mosca a través de dos métodos: por inyección en el blastodermo precelular en embriones o como transgenes. Se ha demostrado que, para las células de *Drosophila*, la inyección de RNAdc desde 200 pbs hasta 2000 pbs, así como los RNAsi de 21–22 nts inyectados en embriones, tienen potentes actividades de interferencia (Perrimon *et al.*, 2010).

El RNAi se usa frecuentemente en *D. melanogaster* para estudios de bajo rendimiento o para estudiar los efectos de la interrupción de uno o unos pocos genes en una etapa específica o tejido, por ejemplo, usando el sistema GAL4-UAS *in vivo*, el cual se ha utilizado en este trabajo. Las proteínas de *Drosophila* se pueden expresar de forma dependiente del tejido y el tiempo en la mosca. En la mayoría de los modelos de enfermedad de *Drosophila*, se inserta un transgén relacionado con la enfermedad humana aguas abajo de un UAS (secuencia de activación en sentido ascendente) y puede expresarse bajo el control del activador transcripcional de levadura GAL4. La ausencia de GAL4 da como resultado la inactividad del transgén. Después de cruzar las moscas que llevan el transgén a las moscas que expresan GAL4 bajo el control de un promotor específico de células o tejidos [Figura 4], la expresión de la proteína se restringe posteriormente a los tejidos que expresan GAL4 (Mohr, 2014).

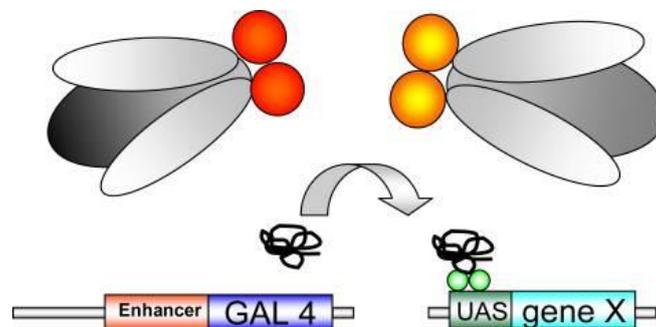


Figura 4. Mosca que expresa GAL4 y promotor específico (izquierda) y mosca que expresa el transgén aguas abajo de un UAS (derecha). Moscas necesarias para realizar el cruce y obtener el sistema GAL4-UAS (Jeibmann y Paulus, 2009).

Generalmente, los grupos de investigación no producen sus propias moscas transgénicas, sino que utilizan colecciones ya desarrolladas por grandes centros de referencia con la máxima eficiencia. Las colecciones más reconocidas son las Transgenic RNAi Project de la Escuela de Medicina de Harvard (TRiP) al cual se puede acceder a través de Bloomington Drosophila Stock Center (BDSC), las del Vienna Drosophila RNAi center (VDRC) y del National Institute of Genetics en Japón (NIGJapan) (Ñungo, 2018).

El esquema para desarrollar experimentos de cribado *in vivo* con RNAi implica desarrollar un experimento compatible con el sistema de RNAi usando cruces de hembras vírgenes que llevan el controlador o driver GAL4 con machos que portan el RNAi transgénico. Luego, se deben establecer los controles positivos y negativos para incluirlos en el cribado. Posteriormente, se debe iniciar la fase de test donde se observan los diferentes resultados ya sean positivos

(cambios en el fenotipo) o negativos (fallos en los cruces o aumento de la letalidad), y finalmente, se hace el análisis de los datos obtenidos (Mohr, 2014).

2. Objetivos

Los objetivos de este trabajo son:

1. Identificar modificadores genéticos del gen *SCN1A* entre los 11 genes candidatos en el modelo *para^{bss1}* de *Drosophila melanogaster* a través de ensayos de:
 - Tiempo de recuperación tras una crisis
 - Supervivencia
 - Capacidad locomotora en ensayos de exploración

2. Determinar si los cromosomas equilibradores también modifican el fenotipo de forma inespecífica.

3. Materiales y métodos

En este apartado se describen las moscas transgénicas utilizadas para el estudio de los genes modificadores, los ensayos realizados para ellos y las herramientas estadísticas usadas.

3.1. Colección de moscas

Las cepas de *Drosophila melanogaster* [Tabla 2] fueron cultivadas en tubos transparentes con medio de levaduras, agua, antifúngico y antibacteriano a 25°C.

Tabla 2. Genes candidatos a modificadores genéticos de SCN1A.

Gen Humano	Gen en <i>D. melanogaster</i>	Nº Stock BDSC	Genotipo
CACNA1A	<i>Cac</i>	27244	y[1] v[1]; P{y[+7.7] v[+1.8]=TRiP.JF02572}attP2
CACNB4	<i>Ca-β</i>	29575	y[1] v[1]; P{y[+7.7] v[+1.8]=TRiP.JF03254}attP2
CHRN2	<i>nAChRα1</i>	28688	y[1] v[1]; P{y[+7.7] v[+1.8]=TRiP.JF03103}attP2
CLCN1	<i>Clc-a</i>	53337	y[1] sc[*] v[1]; P{y[+7.7] v[+1.8]=TRiP.HMC03566}attP40/CyO
GABRA1	<i>CG8916</i>	25854	y[1] v[1]; P{y[+7.7] v[+1.8]=TRiP.JF01875}attP2
HLF	<i>Pdp1</i>	26212	y[1] v[1]; P{y[+7.7] v[+1.8]=TRiP.JF02110}attP2
CACNA1G	<i>Cα1T</i>	26251	y[1] v[1]; P{y[+7.7] v[+1.8]=TRiP.JF02150}attP2
CHRNA4	<i>nAChRα4</i>	31985	y[1] v[1]; P{y[+7.7] v[+1.8]=TRiP.JF03419}attP2
KCNQ3	<i>KCNQ</i>	27252	y[1] v[1]; P{y[+7.7] v[+1.8]=TRiP.JF02562}attP2
KCNMA1	<i>Slo</i>	31677	y[1] v[1]; P{y[+7.7] v[+1.8]=TRiP.JF01470}attP2
PAX6	<i>Toy</i>	33679	y[1] sc[*] v[1]; P{y[+7.7] v[+1.8]=TRiP.HMS00544}attP2
SCN1A	<i>paralytic</i>	Elaborado en el laboratorio.	$\frac{\text{para } bss1}{\text{para } bss1} ; \frac{\text{elav}}{\text{cyo}} ; \frac{+}{+}$

Los cruces se muestran detalladamente en Anexo.

3.2. Ensayos

Para cada réplica biológica se utilizaron moscas control (*para^{bss1}*) y moscas experimentales (*para^{bss1}* + RNAi del gen modificador).

3.2.1. Ensayos de crisis

En este ensayo se llevaron a cabo 3 réplicas biológicas. Para cada grupo de moscas (n=12) fue realizado un ensayo de crisis. Se pasan las moscas, de forma suave para no provocar ninguna crisis, a un tubo vacío (sin alimento) durante 1 hora para que estas se habitúen al ayuno. Una vez pasada esa hora, se dan diez segundos de vórtex a máxima potencia al tubo con las moscas. Este proceso de agitación se lleva a cabo para provocar las crisis en las moscas. A continuación, se deja reposar el tubo y grabamos en vídeo la recuperación de estas para así luego poder contabilizar el tiempo de recuperación de la crisis de cada una de las moscas. Una mosca se considera recuperada de una crisis cuando se pone de pie.

3.2.2. Ensayos de supervivencia

En este ensayo se llevó a cabo 1 réplica biológica. Para cada grupo de moscas (n=20) fue realizado un ensayo de supervivencia. Se pasan las moscas a un tubo nuevo con comida cada 3 días. Al cambiarlas a un nuevo tubo, se anotan el número de moscas que han fallecido en esos 3 días.

3.2.3. Ensayos de locomoción

En este ensayo se llevaron a cabo 3 réplicas biológicas. Para cada grupo de moscas (n=2) fue realizado un ensayo de locomoción. Se pasan las moscas, de forma suave para no provocar ninguna crisis, a un tubo vacío (sin alimento) durante una hora para que estas se habitúen al ayuno. Una vez pasada esa hora, se graba individualmente el recorrido de cada mosca durante 10 minutos dentro de un espacio circular cerrado (placa) y con una fuente inferior de luz, para posteriormente extraer la longitud del recorrido de la mosca durante este período de tiempo y observar si su capacidad de exploración del terreno es mayor o menor. La grabación del video se realiza mediante el programa informático VirtualDub, que posteriormente permitirá obtener una imagen cada 0,5 segundos del vídeo realizado, para así poder adquirir los datos deseados. Una vez obtenidas las imágenes, son cargadas en el programa ImageJ. Este programa permite eliminar todos los puntos de las imágenes que no sean la mosca [Figura 5] [Figura 6] (Stone *et al.*, 2014).



Figura 5. Imagen obtenida con el programa informático ImageJ. Se muestran en rojo aquellos puntos de la imagen que no son de tono blanquecino/gris claro.

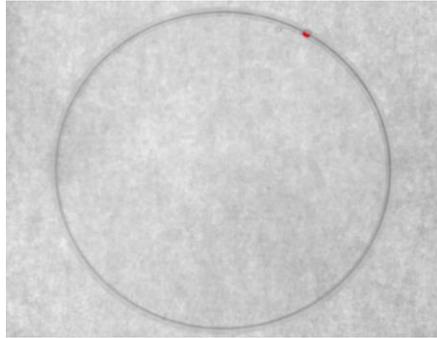


Figura 6. Imagen obtenida con el programa informático ImageJ. Tras modificar la escala de color, se muestra en rojo únicamente el punto donde está la mosca.

A continuación, ImageJ ofrece un fichero con las coordenadas de la mosca cada 0,5 segundos (tiempo entre una imagen y otra) y una imagen con el recorrido total de la mosca [Figura 7] [Figura 8].



Figura 7. Imagen obtenida con el programa informático ImageJ. Ejemplo del recorrido de una mosca, la cual tiene poca capacidad de exploración y su recorrido es de poca distancia.

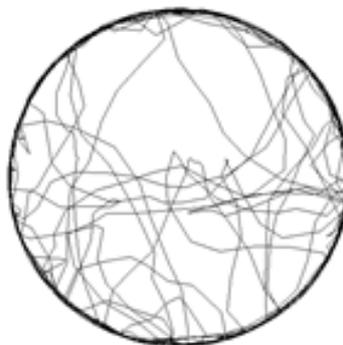


Figura 8. Imagen obtenida con el programa informático ImageJ. Ejemplo del recorrido de una mosca, la cual tiene una gran capacidad de exploración y su recorrido es de mucha distancia.

A partir de las coordenadas, se usa el programa Excel para obtener la velocidad y la distancia recorrida de la mosca en cada fracción de tiempo, además de la velocidad media y la distancia total recorrida en los 10 minutos. Para ello, se usa la siguiente fórmula

3.3. Análisis de datos

Para las representaciones gráficas y los análisis estadísticos empleados de los tres ensayos realizados se utilizó el programa GraphPadPrism 5 (GraphPad Software, Inc, California) y el Excel (Microsoft, Alburquerque). El análisis de t-student de dos colas se llevó a cabo para ver diferencias en el tiempo de recuperación, vida media y distancia recorrida entre distintos genotipos en los casos con igual varianza. Cuando las varianzas no eran iguales se aplicó Mann Whitney test. Para conocer si las distribuciones eran normales se aplicó el test Kolmogorov-Simirnov con el Pvalue Dallal-Wilkinson-Lilliefor. La significancia estadística de todos los análisis se midió con el parámetro P-value, tomando como referencia el valor de alfa 0,05 (95% de intervalo de confianza) para determinar su significación estadística (Planells, 2017).

4. Resultados

4.1. Genes modificadores de *SCN1A*

La finalidad de este trabajo es encontrar genes modificadores del gen *SCN1A*. Para ello, se han seleccionado 11 genes candidatos a modificadores genéticos. Esta selección se llevó a cabo en un trabajo de fin de máster previo (Ñungo, 2018): se realizó una búsqueda en la literatura de diversos genes humanos que podrían ser candidatos a modificadores genéticos de *SCN1A* en la base de datos MEDLINE a través de PubMed usando los términos como “genetic modifiers AND epilepsy”.

Para cada uno de estos genes se buscó la secuencia de aminoácidos de la proteína que codifican en formato FASTA en la base de datos del NCBI. Posteriormente, se analizaron estas secuencias en el BLAST de aminoácidos de flybase.org para buscar posibles homólogos en *D. melanogaster* y determinar su grado de homología. Luego de este análisis, se descartaron algunos genes por pobre homología, ausencia de cepas disponibles de moscas transgénicas en el Bloomington Drosophila Stock Center (BDSC) o porque en la mosca un mismo gen ejerce la función de varios genes humanos.

Finalmente, se buscaron las moscas transgénicas con RNAi para cada uno de estos genes escogiéndose aquellos que se desarrollaron en el Proyecto de RNAi Transgénico de la Escuela de Medicina de Harvard (TRiP). Este proyecto ha generado desde 2008 cepas de moscas transgénicas con RNAi usando el sistema GAL4-UAS para inducir la expresión específica de una estructura en horquilla, la cual silencia la expresión del gen blanco a través del RNA de interferencia. Así, la lista para este trabajo quedó compuesta por 11 genes.

Con el fin de corroborar si los genes propuestos pueden ser modificadores de *SCN1A*, se han evaluado los efectos de los mismos en ensayos de tiempo de recuperación a crisis, supervivencia y locomoción. En cada ensayo se utilizan moscas control (*para^{bss1}*) y moscas experimentales (*para^{bss1}* + RNAi del gen candidato a modificador genético). Un ejemplo de los cruces sería el siguiente (el resto se encuentran en Anexo):

$$P: \frac{Y}{para\ bss1} ; \frac{Gal4\ elav}{CyO} ; \frac{+}{+} \times \frac{+}{Y} ; \frac{+}{+} ; \frac{RNAi\ Cac}{RNAi\ Cac}$$

$$\text{EXPERIMENTAL ->} \quad F1: \frac{+}{Y} ; \frac{Gal4\ elav}{+} ; \frac{RNAi\ Cac}{+}$$

$$\text{CONTROL ->} \quad F1: \frac{+}{Y} ; \frac{CyO}{+} ; \frac{RNAi\ Cac}{+}$$

4.1.1. Gen *Cac*

El gen *Cac* (homólogo al gen *CACNA1A* en humanos) codifica la subunidad $\alpha 1A$ del canal de calcio voltaje dependiente tipo P/Q.

En los ensayos de tiempo de recuperación tras una crisis [Figura 9.A] no hay diferencias significativas entre el genotipo control *para*^{bss1} y el genotipo experimental modificador *para*^{bss1} + *Cac*^{RNAi}. Cabe destacar que varias moscas no convulsionan a t=0 s. Esto puede ser debido a una mala ejecución del experimento, tanto por las condiciones del ambiente de trabajo como por las convulsiones provocadas con el vórtex. Parece haber una pequeña disminución de la media del tiempo de recuperación de las crisis en el genotipo *para*^{bss1} + *Cac*^{RNAi}, no siendo significativa la diferencia con la media del genotipo *para*^{bss1}.

En el gráfico supervivencia [Figura 9.B] se puede observar como el genotipo experimental tiene una vida máxima (73 días) y vida media (55 días) mayor que el control, con 62 y 47 días respectivamente. Se aplicó la prueba Mantel-Cox a los datos de supervivencia, obteniéndose un p-valor <0.001. Esto indica que las curvas de supervivencia de los genotipos de estudio son significativamente diferentes.

En el ensayo de locomoción [Figura 9.C], se observa una diferencia significativa con un p-valor <0.05 entre la distancia recorrida por ambos genotipos, siendo mayor en el caso de *para*^{bss1} + *Cac*^{RNAi}.

Conjuntamente, el silenciamiento de *Cac* no sería un buen candidato como supresor del fenotipo del SD.

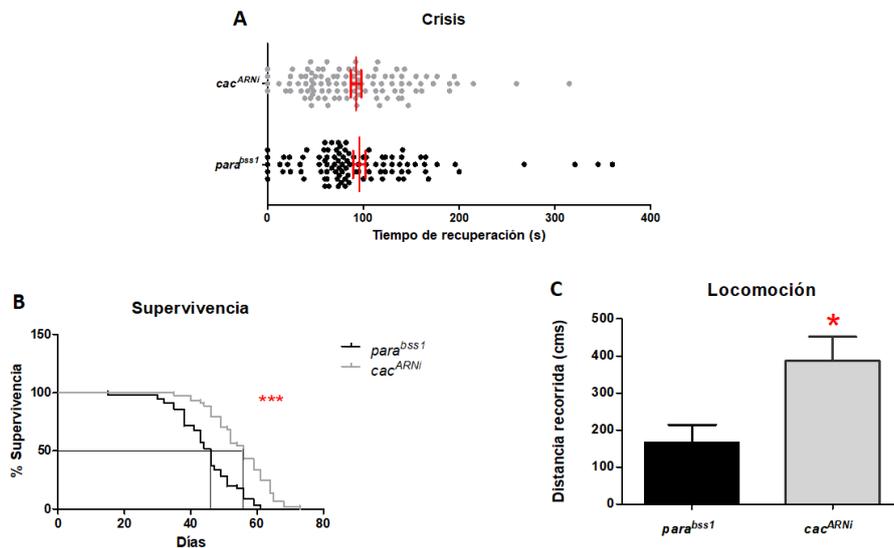


Figura 9. Gen *Cac*. Resultados gráficos de: A: Ensayo de crisis; B: Ensayo de supervivencia; C: Ensayo de locomoción.

4.1.2. Gen *Ca-β*

El gen *Ca-β* (homólogo al gen *CACNB* en humanos) codifica la subunidad auxiliar $\beta 4$ del canal de calcio voltaje dependiente.

En los ensayos de tiempo de recuperación de crisis [Figura 10.A], se observa una diferencia significativa en la media con un p-valor <0.01 , siendo menor en el genotipo experimental *para*^{*bss1*} + *Ca-β*^{*RNAi*}, y convirtiendo el silenciamiento de *Ca-β* en un posible supresor del fenotipo del SD respecto a esta propiedad.

En el gráfico de supervivencia [Figura 10.B] no se observan diferencias respecto a la vida total de las moscas (65 días en ambos genotipos), pero sí una pequeña disminución de la vida media en *para*^{*bss1*} + *Ca-β*^{*RNAi*} (47 días) respecto al genotipo *para*^{*bss1*} (51 días), no siendo significativa en el estudio.

En el ensayo de locomoción [Figura 10.C], hay diferencias muy claras y significativas entre las medias de las distancias recorridas de ambos genotipos, donde es mucho mayor en el caso de *para*^{*bss1*} + *Ca-β*^{*RNAi*}.

En conjunto, *Ca-β* puede ser considerado un modificador genético de *para*, ya que, tanto en las crisis como en la locomoción, su silenciamiento se muestra como un buen supresor del fenotipo del SD.

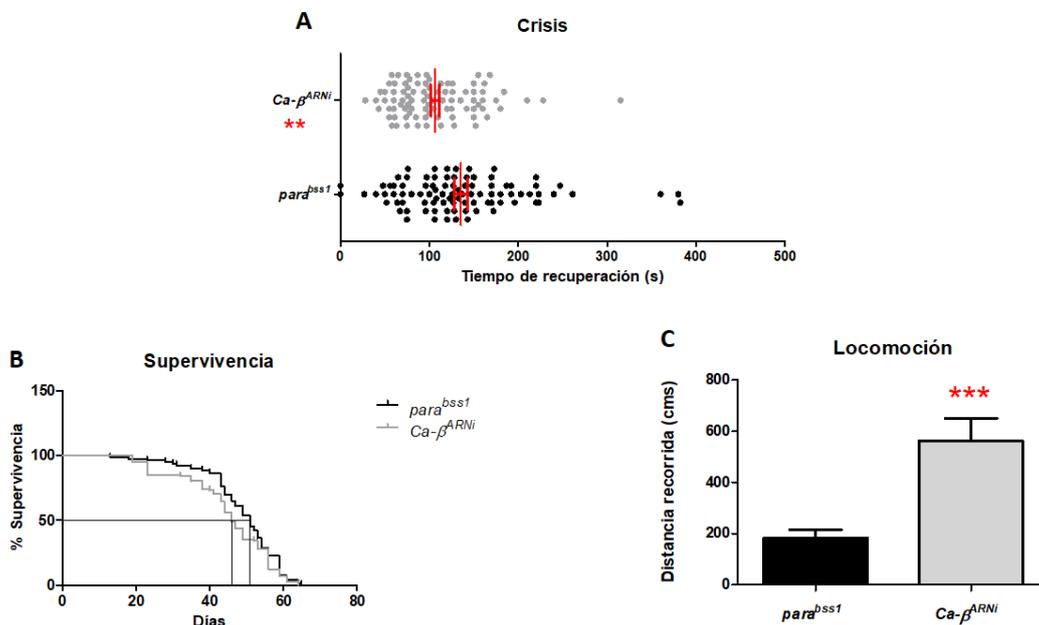


Figura 10. Gen *Ca-β*. Resultados gráficos de: A: Ensayo de crisis; B: Ensayo de supervivencia; C: Ensayo de locomoción.

4.1.3. Gen *nAChR α 1*

El gen *nAChR α 1* (homólogo al gen *CHRNA2* en humanos) codifica la subunidad β 2 del receptor colinérgico neuronal nicotínico.

En los ensayos de tiempo de recuperación tras una crisis [Figura 11.A] se puede observar una mínima diferencia, y no significativa, entre las medias del tiempo de recuperación de crisis del genotipo control *para^{bss1}* y el genotipo experimental *para^{bss1} + nAChR α 1^{RNAi}*.

En cuanto al ensayo de supervivencia [Figura 11.B], destaca la gran diferencia entre la vida media de los genotipos, siendo mucho mayor la de *para^{bss1} + nAChR α 1^{RNAi}* (59 días frente a los 50 días del genotipo *para^{bss1}*). También es mayor la vida total en *para^{bss1} + nAChR α 1^{RNAi}* (73 días frente a 63 días del genotipo *para^{bss1}*), convirtiendo el silenciamiento de este gen en un posible supresor del fenotipo del SD en esta propiedad.

En el ensayo de locomoción [Figura 11.C], se puede ver una diferencia significativa con un p-valor <0.01 en la distancia recorrida por las moscas, siendo mayor en el genotipo *para^{bss1} + nAChR α 1^{RNAi}*.

Conjuntamente, el silenciamiento de este modificador genético de *para* no muestra una gran variación respecto a la mosca control, ya que únicamente se observa una diferencia destacable en la probabilidad de supervivencia de las moscas.

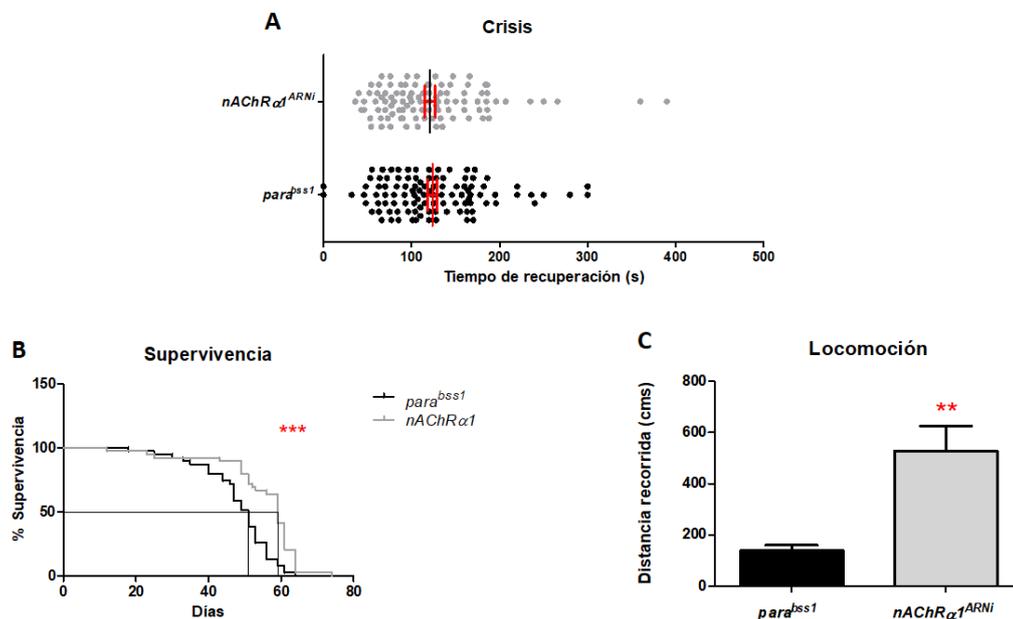


Figura 11. Gen *nAChR α 1*. Resultados gráficos de: A: Ensayo de crisis; B: Ensayo de supervivencia; C: Ensayo de locomoción.

4.1.4. Gen *Clc-a*

El gen *Clc-a* (homólogo al gen *CLCN1* en humanos) codifica el canal de cloro voltaje dependiente I.

En los ensayos de tiempo de recuperación tras una crisis [Figura 12.A], se observa una diferencia significativa entre las medias de ambos genotipos, siendo mucho menor en *para^{bss1} + Clc-a^{RNAi}*. Es destacable la existencia de varias moscas que no convulsionan en tiempo cero.

En el gráfico de supervivencia [Figura 12.B], se observa una vida media algo diferente en ambos genotipos (60 días en *para^{bss1} + Clc-a^{RNAi}* y 52 días en *para^{bss1}*). La vida total es prácticamente la misma (77 días).

En el ensayo de locomoción [Figura 12.C], la distancia recorrida por las moscas *para^{bss1} + Clc-a^{RNAi}* es destacablemente mayor que en las moscas *para^{bss1}*, con un p-valor <0,001.

El silenciamiento de este gen modificador de *para* podría ser un candidato a supresor del fenotipo del SD, ya que en todos los ensayos se obtienen diferencias significativas, sobre todo en los tiempos de recuperación de las crisis y las distancias recorridas.

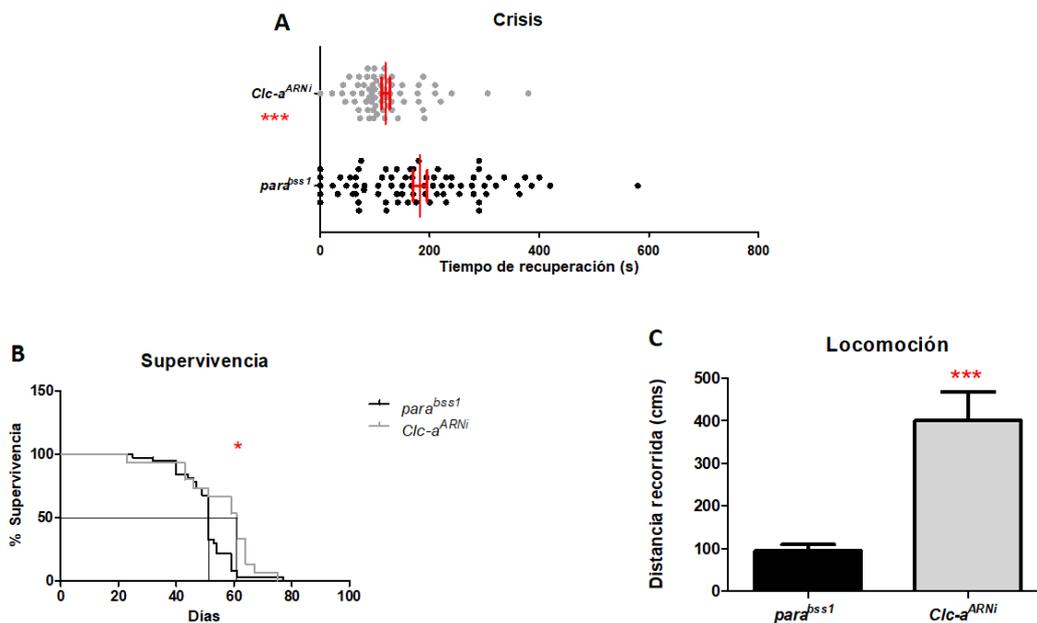


Figura 12. Gen *Clc-a*. Resultados gráficos de: A: Ensayo de crisis; B: Ensayo de supervivencia; C: Ensayo de locomoción.

4.1.5. Gen *CG8916*

El gen *CG8916* (homólogo al gen *GABRA1* en humanos) codifica la subunidad $\alpha 1$ del receptor de GABA tipo A.

En los ensayos de crisis [Figura 13.A] hay una gran diferencia en cuanto al tiempo de recuperación de las crisis, siendo mucho menor en el genotipo *para^{bss1} + CG8916^{RNAi}*. Además, en este caso también hay varias moscas que no convulsionan en tiempo cero.

En el gráfico de supervivencia [Figura 13.B], se observa que la vida media es mayor en el genotipo *para^{bss1} + CG8916^{RNAi}* (52 días frente a 48 días del genotipo *para^{bss1}*). La vida total también lo es: 68 días de *para^{bss1} + CG8916^{RNAi}* frente a 60 días del genotipo *para^{bss1}*.

En el ensayo de locomoción [Figura 13.C] la diferencia es significativa con un p-valor <0.01, siendo mayor la distancia recorrida por *para^{bss1} + CG8916^{RNAi}*.

En conjunto, el silenciamiento de *CG8916* podría ser un muy buen supresor del fenotipo del SD, ya que en los ensayos de crisis y supervivencia se obtienen unos resultados significativos con un p-valor <0.001 y <0.01 respectivamente, donde disminuyen en gran medida el tiempo de recuperación de las crisis y aumentan la vida media de las moscas.

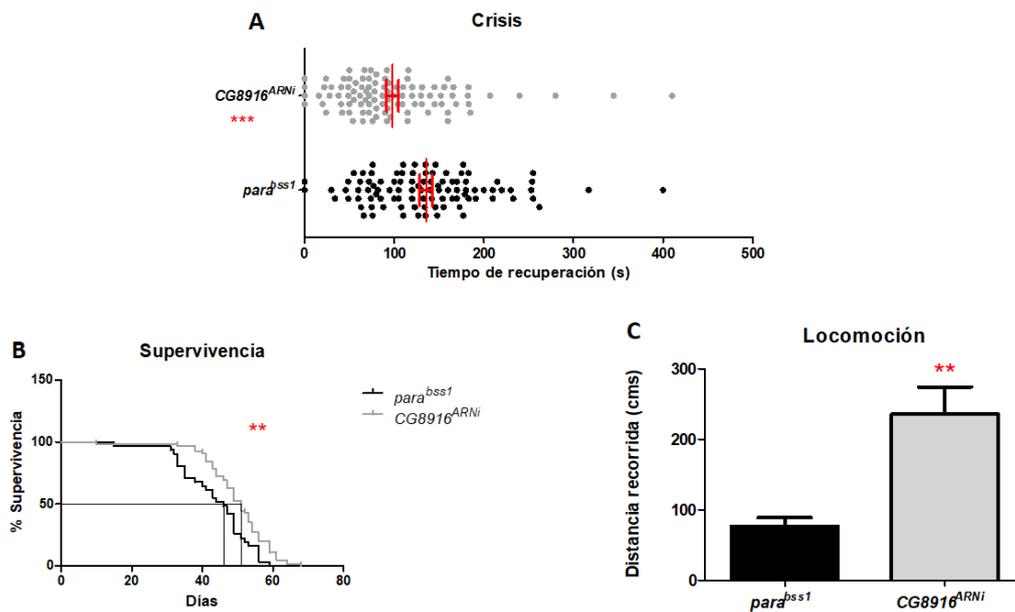


Figura 13. Gen *CG8916*. Resultados gráficos de: A: Ensayo de crisis; B: Ensayo de supervivencia; C: Ensayo de locomoción.

4.1.6. Gen *Pdp1*

El gen *Pdp1* (homólogo al gen *HLF* en humanos) codifica el factor de leucemia hepático.

En los ensayos de crisis [Figura 14.A], se puede apreciar una pequeña disminución del tiempo de recuperación de crisis en el genotipo *para^{bss1} + Pdp1^{RNAi}*, pero no es significativa. También hay varias moscas que no convulsionan en tiempo cero.

En el ensayo de supervivencia [Figura 14.B], la vida media de *para^{bss1} + Pdp1^{RNAi}* es mayor que la de *para^{bss1}* (61 días y 54 días respectivamente). Cabe destacar que antes del día 50, la situación era contraria: la probabilidad de sobrevivir de *para^{bss1} + Pdp1^{RNAi}* es menor que la de *para^{bss1}*. La vida total es igual en ambos (78 días).

En el ensayo de locomoción [Figura 14.C], se puede ver una diferencia en la distancia recorrida con un p-valor <0.01, siendo mayor en *para^{bss1} + Pdp1^{RNAi}*.

En su totalidad, el silenciamiento de *Pdp1* no sería un claro supresor del fenotipo del SD en un principio. Esto es debido a que únicamente los resultados del ensayo de la supervivencia son significativos con un p-valor <0.01.

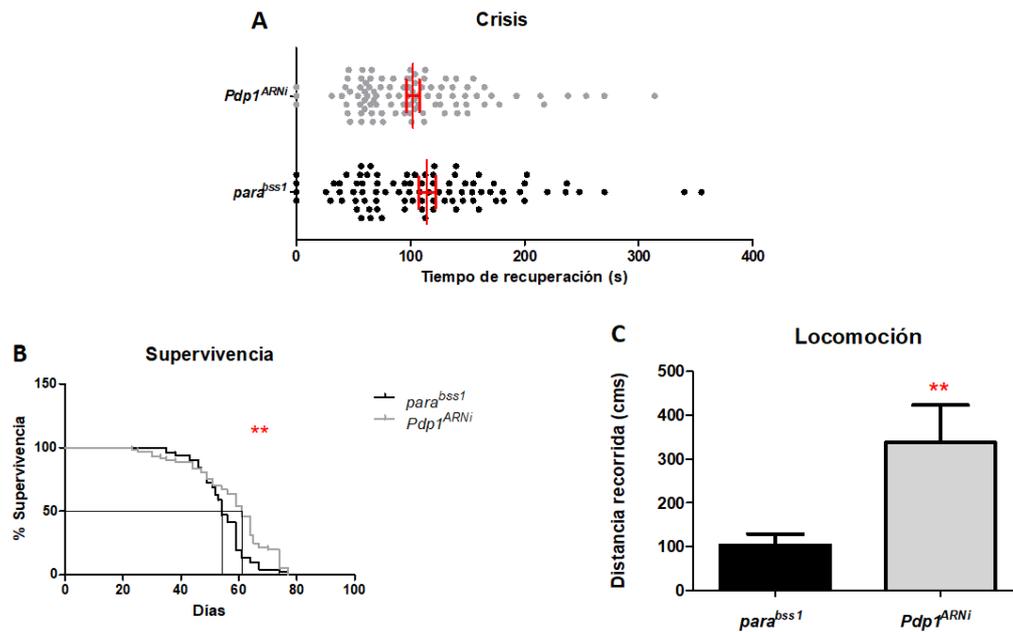


Figura 14. Gen *Pdp1*. Resultados gráficos de: A: Ensayo de crisis; B: Ensayo de supervivencia; C: Ensayo de locomoción.

4.1.7. Gen *Caa1T*

El gen *Caa1T* (homólogo al gen *CACNA1G* en humanos) codifica la subunidad $\alpha 1G$ del canal de calcio voltaje dependiente tipo T.

En los ensayos de tiempo de recuperación tras una crisis [Figura 15.A], se observa una gran disminución del tiempo de recuperación de crisis en *para*^{bss1} + *Caa1T*^{RNAi}, así como una gran cantidad de moscas que no convulsionan a tiempo cero.

En el gráfico de supervivencia [Figura 15.B], hay una diferencia significativa (con un p-valor <0.001) en cuanto a la vida media, siendo esta mayor en *para*^{bss1} + *Caa1T*^{RNAi} (49 días frente a 42 días de *para*^{bss1}). También es mayor la vida total (65 días frente a 56 días del genotipo *para*^{bss1}).

En el ensayo de locomoción [Figura 15.C], la distancia recorrida por el genotipo *para*^{bss1} + *Caa1T*^{RNAi} es mayor que la recorrida por *para*^{bss1}.

El conjunto de estos tres ensayos postula el silenciamiento de *Caa1T* como un buen supresor del fenotipo del SD, ya que los resultados de los ensayos de crisis y supervivencia son significativos, con un p-valor <0.001 en ambos.

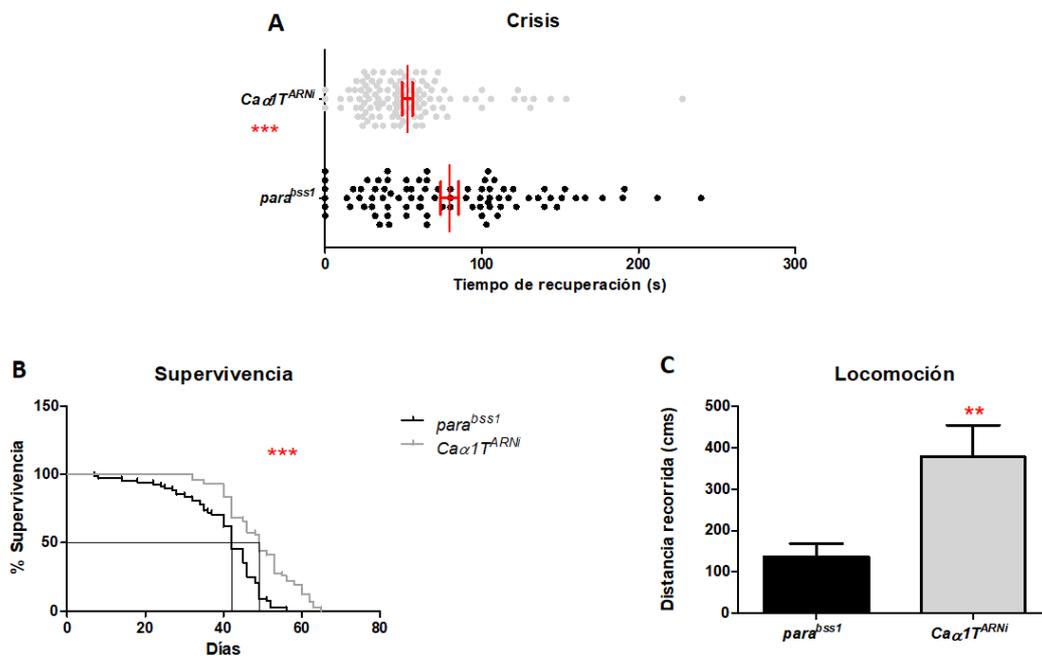


Figura 15. Gen *Caa1T*. Resultados gráficos de: A: Ensayo de crisis; B: Ensayo de supervivencia; C: Ensayo de locomoción.

4.1.8. Gen *nAChR α 4*

El gen *nAChR α 4* (homólogo al gen *CHRNA4* en humanos) codifica la subunidad α 2 del receptor colinérgico neuronal nicotínico.

En los ensayos de crisis [Figura 16.A], el tiempo de recuperación en *para*^{bss1} + *nAChR α 4*^{RNAi} es mucho menor que en *para*^{bss1}, con un p-valor <0.001.

En el ensayo de supervivencia [Figura 16.B], la vida media de las moscas es mucho mayor en *para*^{bss1} + *nAChR α 4*^{RNAi} (53 días frente a 42 días en *para*^{bss1}). La vida total es la misma en ambos genotipos (63 días).

En cuanto al ensayo de locomoción [Figura 16.C], hay poca diferencia entre la distancia recorrida por ambos, siendo mayor la de *para*^{bss1} + *nAChR α 4*^{RNAi}.

El silenciamiento de *nAChR α 4* podría ser un candidato a supresor del fenotipo del SD, ya que los tiempos de recuperación de crisis en *para*^{bss1} + *nAChR α 4*^{RNAi} son mucho menores, y la vida media aumenta significativamente con respecto a *para*^{bss1}.

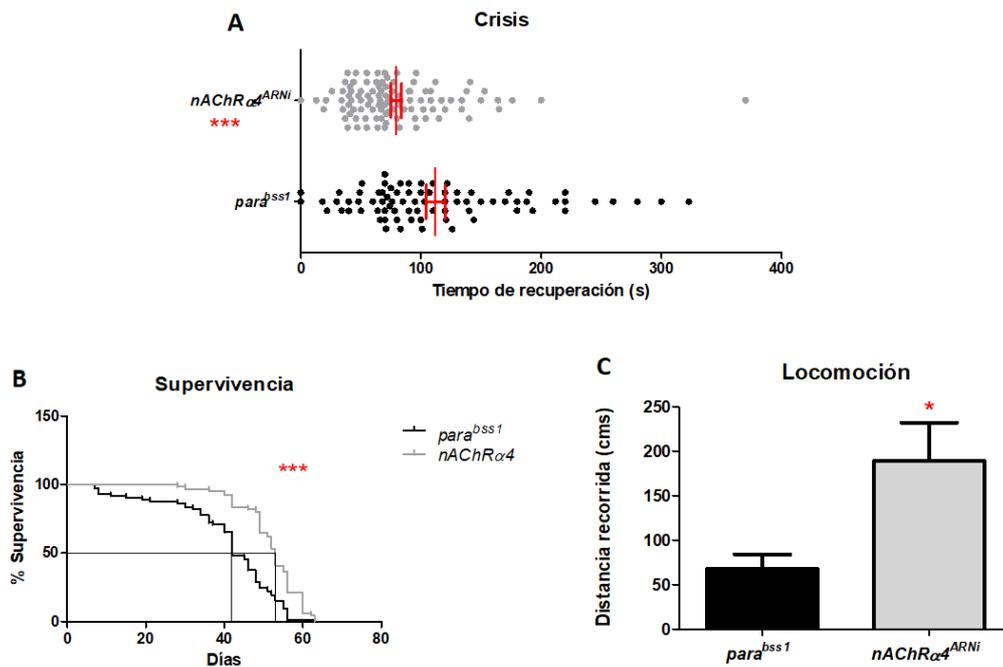


Figura 16. Gen *nAChR α 4*. Resultados gráficos de: A: Ensayo de crisis; B: Ensayo de supervivencia; C: Ensayo de locomoción.

4.1.9. Gen *KCNQ*

El gen *KCNQ* (homólogo al gen *KCNQ3* en humanos) codifica el miembro 3 de la subfamilia KQT del canal de potasio voltaje dependiente.

En los ensayos de crisis [Figura 17.A], el tiempo de recuperación es significativamente menor (p -valor <0.001) en *para*^{*bss1*} + *KCNQ*^{*RNAi*}.

Lo mismo ocurre en el ensayo de supervivencia [Figura 17.B], donde la vida media de este genotipo (*para*^{*bss1*} + *KCNQ*^{*RNAi*}) es mayor (58 días frente a los 48 días de *para*^{*bss1*}). En cambio, la vida total es prácticamente la misma en ambos genotipos (67 días).

En el ensayo de locomoción [Figura 17.C], la distancia recorrida por el genotipo *para*^{*bss1*} + *KCNQ*^{*RNAi*} es mayor que la recorrida por el genotipo *para*^{*bss1*}.

En conjunto, el silenciamiento de este gen puede considerarse un buen candidato a supresor del fenotipo del SD, ya que los resultados tanto del ensayo de crisis como de supervivencia así lo demuestran.

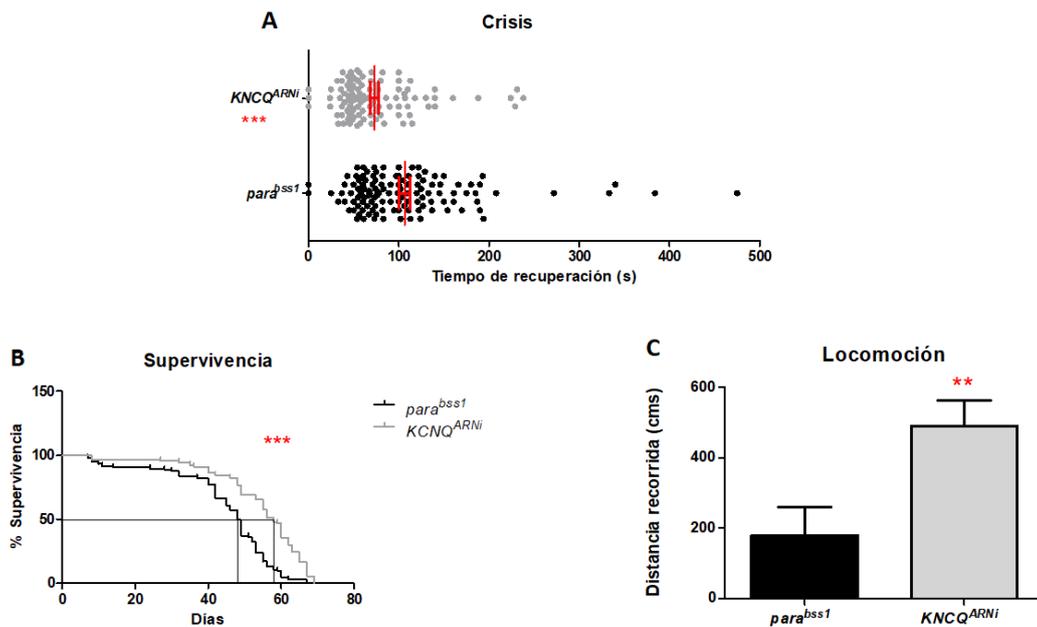


Figura 17. Gen *KCNQ*. Resultados gráficos de: A: Ensayo de crisis; B: Ensayo de supervivencia; C: Ensayo de locomoción.

4.1.10. Gen *Slo*

El gen *Slo* (homólogo al gen *KCNMA1* en humanos) codifica el canal de potasio activado por calcio de la subfamilia $M\alpha 1$.

En el ensayo de crisis [Figura 18.A], el tiempo de recuperación es menor en $para^{bss1} + Slo^{RNAi}$, pero la diferencia con el tiempo de recuperación de $para^{bss1}$ es pequeño (p -valor <0.05). En este caso también hay varias moscas que no convulsionan en tiempo cero.

En cuanto al ensayo de supervivencia [Figura 18.B], el genotipo $para^{bss1} + Slo^{RNAi}$ tiene una vida media mucho mayor que $para^{bss1}$ (56 y 42 días respectivamente). Este hecho presenta al silenciamiento de *Slo* como un supresor en el SD respecto a la vida media. La vida total es prácticamente la misma en ambos genotipos (66 días).

En el ensayo de locomoción [Figura 18.C], la distancia recorrida por $para^{bss1} + Slo^{RNAi}$ es mayor.

En conjunto de los 3 ensayos, *Slo* podría ser un punto clave para tratar la enfermedad, ya que su silenciamiento parece ser un buen supresor del fenotipo del SD.

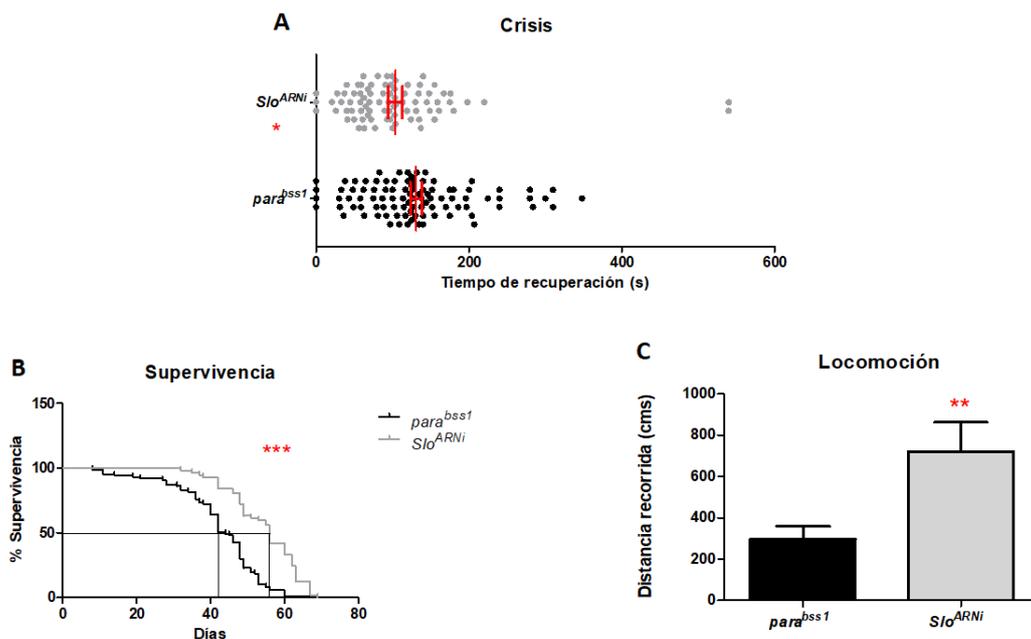


Figura 18. Gen *Slo*. Resultados gráficos de: A: Ensayo de crisis; B: Ensayo de supervivencia; C: Ensayo de locomoción.

4.1.11. Gen Toy

El gen *Toy* (homólogo al gen *PAX6* en humanos) codifica un regulador transcripcional involucrado en la oculogénesis y otros procesos de desarrollo.

En los ensayos de crisis [Figura 19.A], la diferencia entre la media del tiempo de recuperación de ambos genotipos no es significativa, siendo, en este caso, menor en *para^{bss1}*.

En el ensayo de supervivencia [Figura 19.B], la vida media es significativamente mayor (p -valor <0.001) en *para^{bss1}* (40 días frente a los 29 días del genotipo *para^{bss1} + Toy^{RNAi}*). La vida total es también mayor en *para^{bss1}* (60 días frente a 53 días del genotipo *para^{bss1} + Toy^{RNAi}*). Todo esto postula el silenciamiento de *Toy* como un posible potenciador del fenotipo del SD.

En cuanto al ensayo de locomoción [Figura 19.C], la distancia recorrida por el genotipo *para^{bss1} + Toy^{RNAi}* es mayor, con un p -valor <0.05 .

En conjunto, el silenciamiento de este gen es el único de este estudio que se postula como potenciador del fenotipo del SD, particularmente en la disminución de la vida media de las moscas, y por tanto, de la probabilidad de sobrevivir.

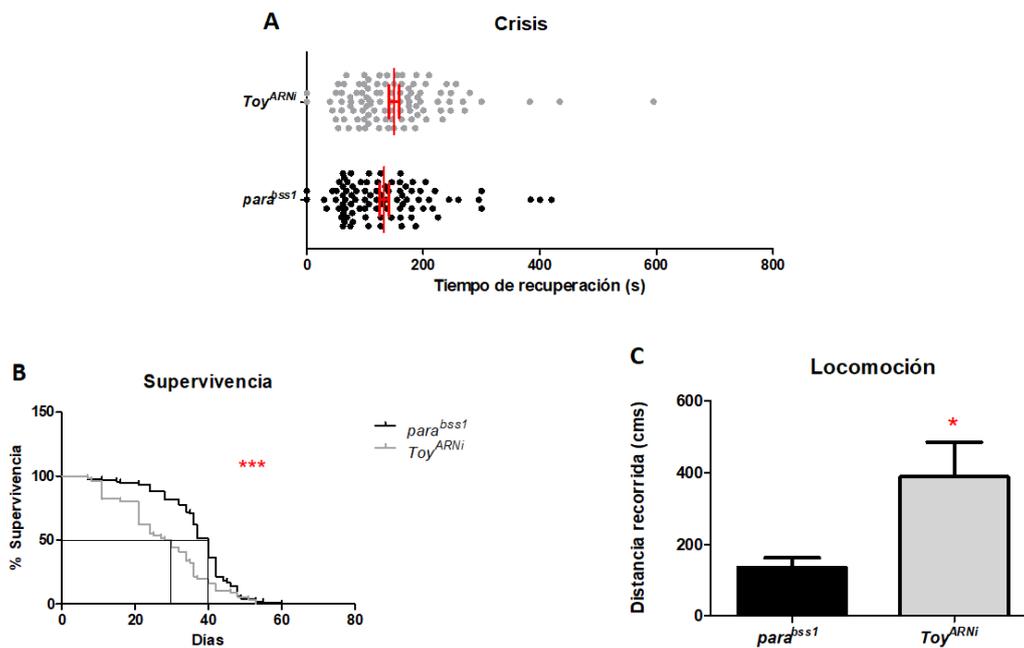


Figura 19. Gen Toy. Resultados gráficos de: A: Ensayo de crisis; B: Ensayo de supervivencia; C: Ensayo de locomoción.

5. Discusión

En esta tabla [Tabla 3] podemos observar la significación estadística de cada uno de los ensayos en cada uno de los genes estudiados.

Tabla 3. Significación estadística de los ensayos de crisis, supervivencia y locomoción.

Gen Humano	Gen en <i>D. melanogaster</i>	Ensayo de crisis	Ensayo de supervivencia	Ensayo de locomoción
<i>CACNA1A</i>	<i>Cac</i>	-	***	*
<i>CACNB4</i>	<i>Ca-β</i>	**	-	***
<i>CHRN2</i>	<i>nAChRα1</i>	-	***	**
<i>CLCN1</i>	<i>Clc-a</i>	***	*	***
<i>GABRA1</i>	<i>CG8916</i>	***	**	**
<i>HLF</i>	<i>Pdp1</i>	-	**	**
<i>CACNA1G</i>	<i>Cα1T</i>	***	***	**
<i>CHRNA4</i>	<i>nAChRα4</i>	***	***	*
<i>KCNQ3</i>	<i>KCNQ</i>	***	***	**
<i>KCNMA1</i>	<i>Slo</i>	*	***	**
<i>PAX6</i>	<i>Toy</i>	-	***	*

El SD es una enfermedad rara infantil epiléptica debida a mutaciones dominantes en el gen *SCN1A* humano. Existe mucha variabilidad en el fenotipo de la enfermedad, incluso para los que tienen la misma mutación. Por tanto, en este trabajo se ha empleado el modelo *para^{bss1}* de *Drosophila melanogaster* por ser *para* el gen homólogo al gen *SCN1A* en la mosca de la fruta y *bss1* una mutación característica de *D. melanogaster*. Para entender esta variabilidad, se han testado 11 genes candidatos a modificadores genéticos del gen *para* en este modelo. Estos alteran o influyen en la expresión de la función de este otro gen. La estrategia genética empleada para alterar su expresión se basa en el uso del sistema UAS-GAL4 para expresar un RNA interferente. La metodología para el estudio de estos once genes es la realización de ensayos de crisis, ensayos de supervivencia y ensayos de locomoción.

Los 11 genes candidatos parecen influir en *para*, y por tanto, también en la enfermedad, ya que, en al menos uno de los tres ensayos, hay diferencias significativas en las medias. Pero los genes que tras este estudio pueden ser considerados como modificadores genéticos de *SCN1A* son los que se exponen a continuación. En el silenciamiento de los genes *CG8916*, *Cα1T*, *KCNQ*, *nAChRα4*, *Clc-a* y *Slo* se observan diferencias importantes en los tres ensayos realizados: disminución del tiempo de recuperación de las crisis, aumento de la vida media y aumento de la longitud recorrida y capacidad de exploración de las moscas, revelando así el silenciamiento de estos genes como posibles supresores del fenotipo del SD. El silenciamiento de *Toy* es el único

potenciador posible del fenotipo del SD en este estudio, mostrando una gran disminución de la vida media de las moscas.

Estos genes podrían ejercer como dianas terapéuticas y herramientas de diagnóstico del SD, ya que han ayudado a esclarecer ciertos aspectos ya mencionados sobre la enfermedad. El estudio ayuda a confirmar que el modelo *para^{bss1}* de *Drosophila melanogaster* es bueno para la investigación del SD.

También hay que tener en cuenta los problemas que han surgido durante la realización de los experimentos: en los ensayos de crisis se presenta mucha variabilidad. En varias ocasiones había moscas que no convulsionaban a tiempo cero, sino más tarde, y moscas que no convulsionaban en todo el ensayo. Además, en la mayoría de los experimentos, había 1 o 2 moscas que se recuperaban de la crisis en un período prolongado de tiempo, saliéndose de la media del grupo de ensayo correspondiente. Esto podría ser debido a las condiciones del medio o a una mala aplicación del vórtex. En los ensayos de supervivencia, normalmente la mosca control vivía menos tiempo, pudiendo deberse esto a la presencia del equilibrador y no por el gen modificador. En los ensayos de locomoción es donde más claro se puede ver el efecto del equilibrador debido a que en todos los casos las moscas experimentales caminaron más que las controles, incluso en el caso de *Toy*, el silenciamiento del cual se hipotetiza como intensificador del fenotipo de la enfermedad. En un principio este ensayo también se iba a usar para comparar no solo las diferencias entre la distancia recorrida, sino también la capacidad de exploración con el fin de encontrar otros defectos cognitivos, pero no fue posible al comprobar que, como se ha indicado, las experimentales caminaban mucho más que las controles. Por tanto, el ensayo de locomoción solo se ha considerado verdaderamente significativo cuando el p-valor <0,001. Se puede concluir que el equilibrador CyO podría alterar los resultados en los ensayos de supervivencia y locomoción, ya que da lugar a moscas con alas curvadas y eso condiciona los resultados de estos ensayos. Además, puede que no influya en las convulsiones. En un futuro, se podrían plantear otros equilibradores para evitar problemas como los mencionados.

Por tanto, este estudio permite postular el silenciamiento de los siguientes modificadores genéticos humanos del gen *SCN1A* como supresores del SD: *GABRA1*, *CACNA1G*, *KCNQ3*, *CHRNA4*, *CLCN1* y *KCNMA1*, y el silenciamiento de *PAX6* como potenciador. Gracias a este trabajo, se descartan los genes restantes como modificadores genéticos: *CACNA1A*, *CACNB4*, *CHRN2* y *HLF*. Se podrían seleccionar los genes elegidos como modificadores genéticos para, en un futuro, volver a realizar los 3 ensayos con una mayor precisión y cantidad de réplicas biológicas, además de subsanar los errores obtenidos en este estudio, principalmente el del equilibrador CyO.

GABRA1, *CACNA1G*, *KCNQ3*, *KCNMA1*, *CHRNA4*, *CLCN1* y *PAX6* podrían ser en un futuro próximo importantes dianas terapéuticas y herramientas de investigación en el SD, ya que, modulándolos con medicamentos específicos, se podrían reducir o eliminar varios síntomas del SD, como disminuir el número de crisis, mejorar la capacidad cognitiva, aumentar la supervivencia, etc.

6. Conclusiones

Por tanto, de este trabajo podemos concluir que:

- El silenciamiento de los genes *CG8916*, *Caa1T*, *KCNQ*, *nAChRα4*, *Clc-a* y *Slo*, modificadores genéticos de *para*, se postula como supresor del fenotipo del SD.
- El silenciamiento del gen *Toy*, modificador genético de *para*, es el único potenciador del fenotipo del SD de este estudio.
- Confirmación de que el modelo *para^{bss1}* de *Drosophila melanogaster* es bueno para la investigación del SD.
- El cromosoma equilibrador CyO puede alterar los resultados de los ensayos de supervivencia y locomoción.

7. Bibliografía

BOUTROS, M.; AHRINGER, J. (2008). The art and design of genetic screens: RNA interference. *Nature Reviews Genetics*, 9(7): 554-566.

CALHOUN, J. D.; HAWKINS, N. A.; ZACHWIEJA, N. J.; KEARNEY, J. A. (2016). Cacna1g is a genetic modifier of epilepsy caused by mutation of voltage-gated sodium channel Scn2a. *Epilepsia*, 57(6): e103–e107.

CARVILL, G. L.; WECKHUYSEN, S.; MCMAHON, J. M.; HARTMANN, C.; MØLLER, R. S.; HJALGRIM, H.; COOK, J.; GERAGHTY, E.; O'ROAK, B. J.; PETROU, S.; CLARKE, A.; GILL, D.; SADLEIR, L. G.; MUHLE, H.; VON SPICZAK, S.; NIKANOROVA, M.; HODGSON, B. L.; GAZINA, E. V.; SULTS, A.; SHENDURE, J.; DIBBENS, L. M.; DE JONGHE, P.; HELBIG, I.; BERKOVIC, S. F.; SCHEFFER, I. E.; MEFFORD, H. C. (2014). GABRA1 and STXBP1: novel genetic causes of Dravet syndrome. *Neurology*, 82(14): 1245–1253.

CHEN, T. T.; KLASSEN, T. L.; GOLDMAN, A. M.; MARINI, C.; GUERRINI, R.; NOEBELS, J. L. (2013). Novel brain expression of ClC-1 chloride channels and enrichment of CLCN1 variants in epilepsy. *Neurology*, 80(12): 1078–1085.

CLAES, L.; DEL-FAVERO, J.; CEULEMANS B.; LAGAE, L.; VAN BROECKHOVEN, C.; DE JONGHE, P. (2001). De novo mutations in the sodium-channel gene SCN1A cause severe myoclonic epilepsy of infancy. *American journal of human genetics*, 68(6): 1327-1332.

DRAVET, C. (2011). Dravet syndrome history. *Developmental medicine & child neurology*, 53(2): 1-6.

FJAER, R.; BRODTKORB, E.; ØYE, A. M.; SHENG, Y.; VIGELAND, M. D.; KVISTAD, K. A.; BACKE, P. H.; SELMER, K. K. (2015). Generalized epilepsy in a family with basal ganglia calcifications and mutations in SLC20A2 and CHRN2. *European Journal of Medical Genetics*, 58(11): 624-628.

GREENSPAN, R. J. (2004). *FLY PUSHING: The theory and Practice of Drosophila Genetics*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor (New York). Second edition.

GUERRINI, R. (2012). Dravet syndrome: The main issues. *European Journal of Paediatric Neurology*, 16(1): S1-S4.

HALES, K. G.; KOREY, C. A.; LARRACUENTE, A. M.; ROBERTS, D. M. (2015). Genetics on the Fly: A Primer on the Drosophila Model System. *Genetics*, 201(3): 815–842.

HAWKINS, N. A.; KEARNEY, J. A. (2016). Hlf is a genetic modifier of epilepsy caused by voltage-gated sodium channel mutations. *Epilepsy research*, 119: 20–23.

HURST, D. L. (1990). Epidemiology of Severe Myoclonic Epilepsy of Infancy. *Epilepsia*, 31(4): 397-400.

JEIBMANN, A.; PAULUS, W. (2009). Drosophila melanogaster as a model organism of brain diseases. *International journal of molecular sciences*, 10(2): 407–440.

KEARNEY, J. A. (2011). Genetic modifiers of neurological disease. *Current opinion in genetics & development*, 21(3): 349-353.

KROLL, J. R.; TANOUYE, M. A. (2013). Rescue of easily shocked mutant seizure sensitivity in *Drosophila* adults. *The Journal of comparative neurology*, 521(15): 3500–3507.

LOPES-CENDES, M. D. I.; OLIVEIRA, P. A. (2013). Aspectos genéticos de las epilepsias: una visión actualizada. *Revista Médica Clínica Las Condes*, 24(6): 909-914.

MOHR, S. E. (2014). RNAi screening in *Drosophila* cells and in vivo. *Methods (San Diego, Calif.)*, 68(1): 82–88.

NORIEGA, D.; VALENCIA, A.; VILLEGAS, B. (2016). Arn de interferencia (ARNi): Una tecnología novedosa con potencial para el control de insectos plaga. *Revista U.D.C.A Actualidad & Divulgación Científica*, 19(1): 25-35.

ÑUNGO, N.C. (2018). *Búsqueda de modificadores de susceptibilidad a crisis epilépticas en un modelo de Síndrome de Dravet en *Drosophila melanogaster* con la mutación para^{bss1}*. Trabajo de Fin de Máster en Biotecnología biomédica. Universitat Politècnica de Valencia.

OHMORI, I.; OUCHIDA, M.; KOBAYASHI, K.; JITSUMORI, Y.; MORI, A.; MICHIE, H.; NISHIKI, T.; OHTSUKA, Y.; MATSUI, H. (2013). CACNA1A variants may modify the epileptic phenotype of Dravet syndrome. *Neurobiology of Disease*, 50: 209-217.

OHMORI, I.; OUCHIDA, M.; MIKI, T.; MIMAKI, N.; KIYONAKA, S.; NISHIKI, T.; TOMIZAWA, K.; MORI, Y.; MATSUI, H. (2008). A CACNB4 mutation shows that altered Cav2.1 function may be a genetic modifier of severe myoclonic epilepsy in infancy. *Neurobiology of Disease*, 32(3): 349-354.

PANDEY, U. B.; NICHOLS, C. D. (2011). Human disease models in *Drosophila melanogaster* and the role of the fly in therapeutic drug discovery. *Pharmacological reviews*, 63(2): 411–436.

PANJWANI, N.; WILSON, M. D.; ADDIS, L.; CROSBIE, J.; WIRRELL, E.; AUVIN, S.; CARABALLO R. H.; KINALI, M.; MCCORMICK, D.; OREN, C.; TAYLOR, J.; TROUNCE, J.; CLARKE, T.; AKMAN, C. I.; KUGLER, S. L.; MANDELBAUM, D. E.; MCGOLDRICK, P.; WOLF, S. M.; ARNOLD, P.; SCHACHAR, R.; PAL, D. K.; STRUG, L. J. (2016). A microRNA-328 binding site in PAX6 is associated with centrotemporal spikes of rolandic epilepsy. *Annals of clinical and translational neurology*, 3(7): 512–522.

PARKER, L.; HOWLETT, I. C.; RUSAN, Z. M.; TANOUYE, M. A. (2011). Seizure and epilepsy: studies of seizure disorders in *Drosophila*. *International review of neurobiology*, 99: 1–21.

PERRIMON, N.; NI, J. Q.; PERKINS, L. (2010). In vivo RNAi: today and tomorrow. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, 2(8): a003640.

PLANELLS, A. (2017). *Generación de un modelo knock-out del gen SCN1A en *Drosophila melanogaster* para el estudio del Síndrome de Dravet*. Trabajo de Fin de Grado en Biotecnología. Universitat Politècnica de Valencia.

STONE, B.; BURKE, B.; PATHAKAMURI, J.; COLEMAN, J.; KUEBLER, D. (2014). A low-cost method for analyzing seizure-like activity and movement in *Drosophila*. *Journal of visualized experiments: JoVE*, (84): e51460.

Páginas Web:

APOYO DRAVET. (2017). Inicio | Acerca de | Qué es el Síndrome de Dravet, visto el 27 de mayo de 1997

<http://www.apoyodravet.eu/acerca-de/que-es-el-sindrome-de-dravet/>

FUNDACIÓN SÍNDROME DE DRAVET. (2019). Síndrome de Dravet | ¿Qué es el síndrome de Dravet?; Diagnóstico; Causas; Síntomas clínicos. Madrid, visto el 27 de mayo de 2019
<https://www.dravetfoundation.eu/sobre-dravet/>

OMIM. (2019). Search. Johns Hopkins University, visto el 26 de mayo de 2019
www.omim.org

ORPHANET. (2019). Enfermedades raras | Búsqueda | Síndrome de Dravet, visto el 26 de mayo de 2019

https://www.orpha.net/consor/cgi-bin/OC_Exp.php?Expert=33069&Ing=ES